

Е. В. ДУЖ, А. Е. ГОНЧАРОВ

## МОНОЦИТАРНЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ *IN VITRO*

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Цель исследования – оценка возможности использования моноцитарных дендритных клеток человека для влияния веществ с предполагаемыми иммуномодулирующими свойствами на функциональную активность антигенпредставляющих клеток *in vitro*. Разработан метод тестирования иммуномодулирующих веществ с использованием моноцитарных дендритных клеток. Отобраны наиболее информативные показатели, пригодные для рутинного тестирования: содержание CD80<sup>+</sup>, CD32<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, ИЛ-12<sup>+</sup> ДК, интенсивность экспрессии молекул CD205 и HLA-DR. Метод отличается высокой повторяемостью, легкой стандартизацией, простотой в выполнении, относительной дешевизной и, одновременно, достаточной информативностью. Показана возможность применения метода для тестирования (скрининга) иммуномодуляторов микробного и, в целом, биологического происхождения. Установлено, что лишь ЛС на основе пробиотических штаммов бактерий обладают выраженными стимулирующими свойствами в отношении ДК. Инозин пранобекс вызывал слабую, но статистически достоверную активацию ДК, что проявилось в усилении экспрессии молекул CD205, CD83, HLA-DR и в усилении продукции ИЛ-12. В то же время, ЛС на основе умифеновира, азоксимера бромида и высокомолекулярного соединения на основе полифенола не оказали влияния на функциональную активность ДК.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, антигенпрезентирующие клетки, иммуномодулирующие лекарственные средства, проточный цитометр.

**Введение.** На сегодняшний день фармацевтический рынок Беларуси и стран СНГ представлен разнообразным ассортиментом иммуномодулирующих лекарственных средств (ЛС), разработка и внедрение в производство которых реализуется быстрыми темпами [5, 11]. Оценка (скрининг) влияния на клетки иммунной системы новых лекарственных средств с предполагаемым иммуномодулирующим действием является необходимой стадией их исследования на доклиническом этапе [1].

На данный момент в информационных базах имеется большое количество научных публикаций и патентов, которые посвящены исследованию иммуномодулирующей активности веществ различного происхождения. Описано и используется множество методов исследования биологической активности иммуномодуляторов как *in vitro*, так и *in vivo*, среди которых можно выделить использование лабораторных животных (преимущественно мыши), крови и клеток крови человека, перевиваемых линий клеток человека и животных [2].

Основным недостатком используемых в настоящее время методов является отсутствие стандартизации и единого подхода к тестированию иммуномодуляторов в части выбора модели исследования, правил подбора концентрации, длительности и условий инкубации, определяемых показателей, метода учета и статистической обработки результатов. Все это приводит к трудности интерпретации результатов, особенно, в случае необходимости сравнения иммуномодулирующей активности разных ЛС (веществ), вызывает сомнения в их эффективности.

Известно, что ДК, как первая линия «обороны» иммунной системы, распознают чужеродные молекулы посредством паттерн-ассоциированных рецепторов (ППР), среди которых выделяют toll-like-рецепторы, рецепторы лектинового типа, NOD-рецепторы, RIG-I-рецепторы и AIM2-подобные рецепторы. Кроме того, ДК экспрессируют широкий спектр рецепторов

компонентов комплемента, Fc-рецепторов, что позволяет им захватывать связанные антигены [9]. Впоследствии ДК отвечают на активирующие стимулы усилением экспрессии различных молекул, среди которых сами ПРР схожие с ними по функции рецепторы, молекулы антигенпредставления и костимуляции, рецепторы к хемокинам, продуцируют цитокины, опосредующие направленность иммунного ответа. Все это позволяет рассматривать ДК в качестве одной из наиболее подходящих моделей для тестирования ЛС из подгруппы иммуномодуляторов.

Так, в работе Carstens M.R. для оценки иммуностимулирующего эффекта PLGA-микрочастиц использовали ДК мыши [18]. После культивирования на протяжении 24 часов ДК фиксировали на слайде и оценивали экспрессию молекул CD80, CD86, HLA-DR, IL-10, IL-12 и индоламин-2;3-диоксигеназы. Имеется патент, в котором описан способ тестирования вакцин, адъювантов, лекарственных средств на смешанной культуре клеток, включающей дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты [19]. Помимо этого, известно применение ДК в иммунотоксикологии [7].

**Целью** данного исследования явилась оценка возможности использования моноцитарных дендритных клеток человека для влияния веществ с предполагаемыми иммуномодулирующими свойствами на функциональную активность антигенпредставляющих клеток *in vitro*.

**Материалы и методы.** *Получение мДК.* Мононуклеарные клетки (МПК) выделяли на градиенте плотности фиколл-пака из 27 образцов периферической крови доноров. Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии. Моноциты культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлениями 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и 50 нг/мл интерлейкина-4 при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> на протяжении 5–6 суток [3, 4].

*Исследуемые вещества.* Для оценки иммуномодулирующей активности тестировали 6 зарегистрированных в Республике Беларусь ЛС (табл. 1).

**Табл. 1.** Исследуемые лекарственные средства

№	Действующее вещество	Используемые концентрации	
		Концентрация 1	Концентрация 2
1.	ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий	35 мкг/мл	175 мкг/мл
2.	ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий	1 мкг/мл	10 мкг/мл
3.	Инозин пранобекс	5 мкг /мл	25 мкг/мл
4.	Умифеновир	50 мкг /мл	250 мкг/мл
5.	Азоксимера бромид	1 мкг/мл	5 мкг/мл
6.	Высокомолекулярное соединение на основе полифенола	50 мкг /мл	100 мкг /мл

Концентрированные растворы исследуемых ЛС готовили в соответствии с известными сведениями о растворимости на фосфатном буферном растворе (DPBS), этиловом спирту или диметилсульфоксиде. Затем, непосредственно перед экспериментом, готовили рабочие растворы данных исследуемых препаратов, добавляя к концентрированным растворам необходимый объем питательной среды.

*Инкубация ДК с исследуемыми веществами.* Взвесь культуры ДК, разливали по лункам 6-луночного планшета. Всего готовили 6 планшета с ДК (6 повторов). Концентрация клеток составляла 500±50 тыс/мл. В лунки добавляли исследуемые ЛС в 2-х концентрациях, а также отрицательный контроль (100 мкл DPBS) и положительный контроль (ЛПС в конечной концентрации 1 мкг/мл). ДК инкубировали с исследуемыми веществами на протяжении 24 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере (85%) с 5% CO<sub>2</sub>. Отбирали 2/3 питательной среды с клетками, которые использовали для определения иммунофенотипа, жизнеспособности/апоптоза, продукции свободных радикалов кислорода (ROS). К оставшейся взвеси клеток добавляли монензин в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали на протяжении 3 ч. Затем клетки снимали и использовали для определения внутриклеточных цитокинов.

*Определение жизнеспособности и апоптоза.* С целью выявления определения мертвых клеток использовали «витальный» интеркалирующий краситель – 7-аминоактиномицин Д (7-AAD), проникающий только через поврежденную клеточную мембрану, а для выявления клеток,

находящихся в стадии апоптоза – аннексин V, конъюгированный с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). В жизнеспособных клетках фосфолипидные компоненты клеточной мембраны находятся на ее внутренней поверхности. В процессе апоптоза происходит транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны. Аннексин V связывается с фосфатидилсеринем в присутствии ионов кальция. ДК суспендировали в аннексин-связывающем буфере, добавляли раствор аннексина V, конъюгированного с ФИТЦ и раствор 7-AAD в концентрации 1 мкг/мл. Клетки инкубировали на протяжении 15 мин при температуре 4 °С в темноте, после чего отмывали от несвязавшихся зондов и ресуспендировали в DPBS.

*Определение поверхностных маркеров клеток.* Для определения экспрессии поверхностных маркеров, к ДК добавляли моноклональные антитела к молекулам CD80, CD86, CD32, CD205, CD197, CD282, CD284, CD83, CD208 и HLA-DR и инкубировали на протяжении 15 мин при +4 °С в темноте. Не связавшиеся антитела удаляли путем центрифугирования ДК в DPBS. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в DPBS.

*Определение внутриклеточных цитокинов.* Взвесь ДК, инкубированных с монензином, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин, после чего отмывали в DPBS. Затем клетки пермеабелизировали в 0,1%-ном растворе сапонина на протяжении 15 мин, после чего снова отмывали в 2,5 мл DPBS. Затем ДК инкубировали с моноклональными антителами к ИЛ-10 и ИЛ-12 на протяжении 30 мин при +4 °С в темноте. По истечении времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител, ресуспендировали в DPBS.

*Определение фагоцитарной активности ДК.* Перед постановкой реакции отмывали ФИТЦ-меченые бактерии несколько раз в большом объеме DPBS. Для постановки реакции взвесь ДК в 1 мл питательной среды ( $1 \times 10^5$ /мл) смешивали с 100 мкл FITC-меченых бактерий ( $1 \times 10^9$ /мл). Инкубировали взвесь при 37 °С в инкубаторе на протяжении 45 мин, после чего отмывали ДК в DPBS.

*Определение продукции свободных радикалов кислорода.* Детекцию ROS осуществляли с использованием дигидрородамина (DHR123). Данное нефлуоресцирующее вещество свободно проникает в клетку, где под действием радикалов кислорода и внутриклеточных эстераз трансформируется в свободный флуоресцеин, который дает яркое свечение преимущественно в зеленом диапазоне. Для постановки реакции к суспензии ДК в питательной среде добавляли DHR123 в конечной концентрации 10 мМ. Инкубировали взвесь при температуре 37 °С на протяжении 30 мин. По истечении времени инкубации ДК отмывали от зонда и ресуспендировали в DPBS.

*Учет результатов.* Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США). Учет образцов включал настройку параметров светорассеяния таким образом, чтобы популяция ДК располагалась в центре цитограммы, построенной в координатах прямого и бокового светорассеяния, настройку пороговых параметров учета по каналам прямого и бокового светорассеяния, чтобы исключить из анализа клеточный детрит, настройку напряжения на каналах флуоресценции с использованием неокрашенного контрольного образца так, чтобы клетки располагались в первой декаде на всех каналах флуоресценции, ручную настройку спектральной компенсации с использованием «single-stained» контролей, анализ исследуемого образца с подсчетом минимум 10 000 клеток. Учитывали как содержание позитивных по исследуемому маркеру клеток (процент экспрессии), так и относительную интенсивность флуоресценции, которая отражает число молекул (в усл. ед.) на клетку. Для анализа данных использовали программу Weasel (WENI, Австралия).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Statistica» версия 10 («StatSoft», США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что ДК отвечают на активирующие стимулы усилением экспрессии различных молекул, среди которых паттерн-ассоциированные и схожие с ними по функции рецепторы, молекулы антигенпредставления и костимуляции, цитокины, опосредующие направленность иммунного ответа.

Нами была проведена оценка широкого спектра молекул, которые могут служить маркерами активации ДК:

- экспрессия маркеров антигенпредставления и костимуляции: CD80, CD86 [8] и HLA-DR [15];
- экспрессия маркеров активации: CD83 [12] и CD208 (DC-LAMP) [13];
- экспрессия молекул CD32 [14] и CD205 [16], характеризующих интернализацию комплексов антиген-антитело, маннозилированных или фукозилированных антигенов;
- экспрессия toll-like рецепторов: CD282, CD284 [9];
- экспрессия маркера миграционной способности ДК: CD197 (CCR7) [6];
- внутриклеточная продукция ИЛ-10 [17] и ИЛ-12 [19];
- показатели жизнеспособности и апоптоза ДК, продукцию свободных радикалов кислорода.

Жизнеспособность ДК в экспериментах, оцениваемая по включению интеркалирующего красителя 7-AAD, всегда составляла выше 85% при медиане от 90,6% до 94,2% (табл. 2). Показатели апоптоза также соответствовали предъявляемым к культурам ДК требованиям.

**Табл. 2.** Показатели апоптоза, жизнеспособности, продукции свободных радикалов кислорода, ИЛ-10 и ИЛ-12 дендритными клетками при сокультивировании с ЛС

Вещество	Жизнеспособность ДК, %		Содержание ДК в состоянии апоптоза, %			
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1		Концентрация 1	
ОК	93,4(91,9–93,9)		4,7(3,7–5,5)			
ПК	93,4(92,0–94,0)		4,4(4,2–4,8)			
ЛС №1	92,5(92,1–96,1)	93,1(92,5–95,5)	1,5(1,4–2,0)		3,2(3,0–3,2)	
ЛС №2	93,4(92,6–94,2)	93,9(92,0–94,6)	3,0(2,6–3,3)		2,7(2,6–3,4)	
ЛС №3	92,4(91,0–94,4)	92,6(92,5–93,5)	3,9(2,8–4,8)		4,1(2,7–4,2)	
ЛС №4	90,6(89,8–92,0)	93,9(91,3–94,1)	1,9(1,9–3,7)		3,7(2,9–3,8)	
ЛС №5	94,2(92,0–94,2)	92,6(92,1–94,8)	2,1(1,4–2,1)		5,6(3,9–5,6)	
ЛС №6	94,2(88,6–99,6)	93,4(89,0–96,1)	3,3(2,0–4,5)		4,1(2,6–4,9)	
Вещество	ДК, продуцирующие свободные радикалы кислорода, %		ИЛ-10, %		ИЛ-12, %	
	Концентрация 1	Концентрация 1	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	10,9(9,8–14,0)		2,9(2,6–3,0)		1,2(0,9–1,8)	
ПК	71,4(70,5–78,6)		2,3(2,2–2,6)		19,2(17,5–25,1)	
ЛС №1	66,9(65,3–70,2)	70,2(69,6–75,6)	2,5(2,2–3,5)	2,9(2,6–3,0)	18,9(18,6–21,2)	20,3(16,9–22,3)
ЛС №2	75,6(74,5–78,9)	74,4(66,6–87,5)	2,4(2,3–2,8)	1,8(1,6–3,1)	16,2(15,6–17,2)	20,3(19,2–26,5)
ЛС №3	11,1(8,8–12,1)	11,8(9,4–14,2)	0,8(0,6–2,8)	2,7(2,5–3,0)	4,9(3,8–5,9)	5,6(4,3–7,8)
ЛС №4	10,3(9,9–12,0)	8,8(8,2–10,1)	2,6(2,1–3,3)	2,7(2,2–2,9)	1,4(1,4–2,0)	0,8(0,6–1,5)
ЛС №5	9,1(9,0–10,4)	9,7(9,6–13,2)	3,0(2,9–3,0)	3,1(3,1–3,1)	1,6(1,5–2,3)	1,5(0,5–1,6)
ЛС №6	12,5(8,6–17,6)	11,4(9,5–14,3)	2,2(1,0–3,9)	3,1(2,1–3,6)	0,8(0,1–1,2)	0,9(0,0–1,5)

Следует отметить, что концентрации ряда веществ (умифеновир, азоксимера бромид) в предварительных экспериментах пришлось существенно уменьшить до значений, при которых сохранялись приемлемые значения показателя жизнеспособности и апоптоза клеток.

Незрелые ДК слабо продуцировали свободные радикалы кислорода (медианное значение – 10,9%) (табл. 2). Как ЛПС, так и ЛС №№1–2 значительно усиливали продукцию свободных радикалов кислорода (до 66–76%), в то же время, добавление ЛС №№3–6 не повлияло на значение данного показателя.

Была исследована внутриклеточная продукция 2-х важнейших для функции иммунитета цитокинов: ИЛ-10 и ИЛ-12, которые продуцируются активированными ДК (табл. 2). Анализ продукции ДК одного из главных цитокинов, опосредующих иммуносупрессию – ИЛ-10 показал отсутствие достоверных различий между клетками, инкубированными как с ЛС, так и с ЛПС. Продукция ИЛ-12 в отсутствие стимуляции минимальная и составляет 1,2(0,9–1,8) %. В то же время, добавление ЛПС в качестве индуктора созревания и ЛС №№1–2 на основе бактерий, приводило к увеличению числа продуцирующих этот цитокин ДК до 20%. Культивирование ДК с инозин пранобексом также усиливало продукцию ИЛ-12, при этом, количество ИЛ-12<sup>+</sup> ДК было меньше – от 4,9% до 5,6%, чем в сравнении с ЛПС и ЛС №№ 1–2, но отличалось достоверно от отрицательного контроля ( $p=0,009$ ).

В таблице 3 представлены результаты оценки экспрессии маркеров антигенпредставления и костимуляции: CD80, CD86 и HLA-DR ДК.

Установлено, что лишь ЛС №№ 1–2 на основе лиофилизированных бактерий достоверно усиливают экспрессию молекул CD80 ДК. Экспрессия этой молекулы ДК при сокультивировании с другими ЛС не отличалась существенно от ОК. Достоверных различий в экспрессии CD80 под действием разных концентраций ЛС №№1–2 выявлено не было, что указывает на то, что ЛС на основе бактерий даже в минимальных концентрациях хорошо активируют ДК.

В связи с тем, что все (практически 100%) ДК экспрессируют в той или иной степени молекулу CD86, в экспериментах оценивали интенсивность экспрессии этой молекулы. Результаты анализа экспрессии CD86 в целом были схожи с таковыми в отношении молекулы CD80, что подтверждает ранее установленный факт их коэкспрессии в ответ на активационные стимулы. Так были выявлены лишь различия между отрицательным контролем и ЛПС ( $p=0,028$ ), а также ЛС №№1–2 на основе пробиотических штаммов бактерий в высокой концентрации ( $p=0,047$  и  $p=0,03$ , соответственно). Статистически значимых различий между отрицательным контролем и ЛС №№ 1–2 в низкой концентрации не выявлены ( $p=0,076$  и  $p=0,175$ ), что указывает на невысокую чувствительность определения данного маркера в качестве активационного.

Культивирование ДК с ЛПС в качестве положительного контроля увеличило экспрессию HLA-DR на клетках в 2 раза. Добавление ЛС №1 на основе лизата бактерий и ЛС № 2 на основе живых бактерий также достоверно усилило экспрессию маркера HLA-DR на поверхности ДК ( $p<0,05$ ). Инозин пранобекс в концентрации 5 мкг/мл не оказал существенного влияния на экспрессию HLA-DR ( $p=0,602$ ), а в концентрации 25 мкг/мл – усиливаю экспрессию этой молекулы ( $p=0,106$ ).

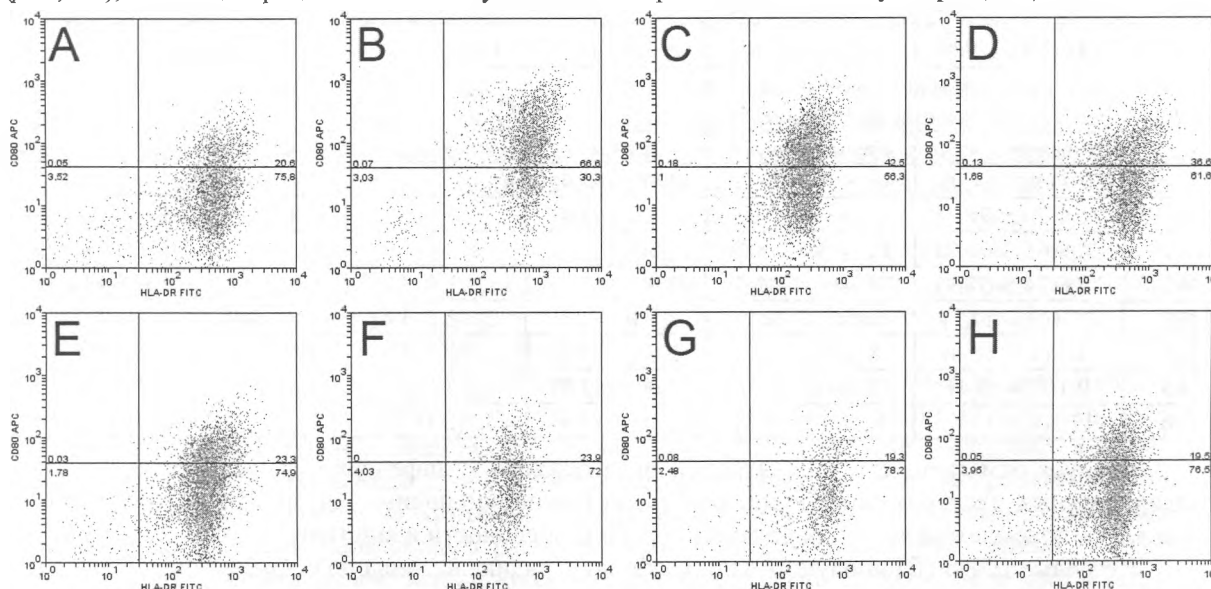


Рис. 1. Экспрессия молекул CD80 и HLA-DR мДК. А – отрицательный контроль (DPBS), В – положительный контроль (ЛПС), С – ЛС № 1, D – ЛС № 2, E– ЛС № 3, F– ЛС № 4, G– ЛС № 5, H – ЛС № 6.

Анализ экспрессии молекулы CD32 показал, что усиление экспрессии данной молекулы выявляется лишь на ДК, стимулированных ЛПС и ЛС на основе микроорганизмов ( $p < 0,01$ ) (табл. 3). ЛС синтетического происхождения не изменяли значимо содержание CD32<sup>+</sup> ДК.

**Табл. 3.** Экспрессия молекул CD32, CD80, CD86, CD205 и HLA-DR дендритными клетками при сокультивировании с ЛС

Вещество	CD80 <sup>+</sup> , %		CD86, усл. Ед.		HLA-DR, усл. ед.	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	11,0(8,0–14,0)		23,0(20,6–25,4)		168,0(156,0–197,0)	
ПК	65,0(65,0–75,0)		37,0(32,0–42,1)		320,0(310,0–350,0)	
ЛС №1	26,0(21,0–32,0)	36,7(35,2–39,6)	30,1(29,6–30,6)	30,1(29,8–32,6)	275,2(275,2–285,0)	332,3(331,1–335,4)
ЛС №2	33,0(29,0–36,0)	36,0(28,5–42,1)	32,6(30,4–33,5)	34,5(30,3–36,2)	243,5(242,4–247,8)	294,0(281,9–303,2)
ЛС №3	10,0(9,0–11,0)	7,6(3,4–10,4)	22,1(21,9–25,6)	24,7(21,5–25,3)	184,6(169,0–210,0)	208,8(208,5–209,5)
ЛС №4	11,0(10,0–12,0)	10,2(6,2–10,9)	22,0(20,0–22,2)	21,4(17,5–21,5)	172,3(169,7–176,4)	178,7(173,6–184,1)
ЛС №5	6,2(5,6–11,8)	9,0(6,5–9,8)	19,2(18,3–21,0)	23,6(23,5–25,4)	166,5(157,5–172,7)	188,8(180,4–189,3)
ЛС №6	7,7(5,3–11,0)	8,2(6,2–11,6)	26,4(18,9–35,6)	23,4(12,0–29,4)	119,2(118,2–137,5)	115,1(108,0–125,0)
Вещество	CD32, %		CD205, усл. ед.			
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2		
ОК	19,5(17,5–20,3)		90,7(80,0–94,0)			
ПК	65,8(55,9–66,3)		178,2(150,4–190,2)			
ЛС №1	30,6(27,5–32,1)	48,3(45,6–51,5)	99,8(90,6–100,2)	120,5(112,2–128,9)		
ЛС №2	37,5(32,6–38,9)	55,6(47,0–59,8)	125,6(117,5–135,6)	164,0(150,8–165,0)		
ЛС №3	19,2(17,8–20,0)	21,5(20,2–24,5)	100,1(95,6–105,6)	112,3(105,6–115,6)		
ЛС №4	16,8(14,3–21,4)	19,8(18,9–22,9)	88,2(86,7–96,6)	89,8(82,2–94,9)		
ЛС №5	17,6(17,1–22,1)	19,0(18,6–21,9)	90,5(89,3–95,8)	86,8(85,0–86,9)		
ЛС №6	19,2(17,5–23,5)	20,0(16,4–28,9)	82,7(79,0–86,0)	84,5(73,2–90,4)		

Схожие результаты выявлены в отношении молекулы CD205: ЛПС ( $p=0,009$ ), а также ЛС № 1 в высокой концентрации ( $p=0,01$ ) и ЛС № 2 ( $p=0,016$ ) в обеих концентрациях вызывали усиление экспрессии данного рецептора на ДК. ДК, инкубированные с инозин пранобексом в высокой концентрации, также отличались более высокими значениями экспрессии CD205 в сравнении с ОК ( $p=0,028$ ).

Далее была изучена экспрессия toll-like-рецепторов 2 и 4. Число TLR2<sup>+</sup> ДК, стимулированных с ЛПС, не отличалось достоверно от такого, инкубированного с DPBS в качестве отрицательного контроля, хотя наблюдалась тенденция к увеличению показателя ( $p=0,076$ ) (табл. 4). Инкубация ДК с ЛС № 1 в высокой концентрации ( $p=0,036$ ) и ЛС № 2 в низкой ( $p=0,037$ ) и высокой ( $p=0,047$ ) концентрации приводила к достоверному увеличению числа CD282<sup>+</sup> ДК. Тем не менее, поскольку медианное содержание ДК не превышало 3,6%, определение данного показателя в качестве маркерного признано нами нецелесообразным. Определение экспрессии TLR4 показало, что даже в максимальных концентрациях число CD284<sup>+</sup> ДК не увеличивается статистически достоверно в сравнении с ОК. Была выявлена лишь тенденция в отношении ЛПС ( $p=0,066$ ), а также ЛС № 1 ( $p=0,05$ ) и ЛС № 2 ( $p=0,086$ ). Учитывая незначительное изменение экспрессии данной молекулы в ответ на стимуляцию клеток, было принято решение отказаться от ее определения в дальнейшем.

Экспрессия CD197 на ДК указывает прежде всего на миграционную способность клеток. Ряд веществ способен как усиливать, так и угнетать миграцию ДК. В этой связи, одним из важных этапов в испытаниях веществ, потенциально обладающих иммуностимулирующими свойствами, является контроль миграционной способности АПК. Результаты экспериментов указывают на то, что экспрессия молекулы CD197 не изменилась достоверно при сокультивировании ДК с ЛПС, ЛС

на основе бактерий, инозин пранобексом, азоксимер бромидом, высокомолекулярным соединением на основе полифенола. В то же время, умифеновир в концентрации 35 мкг/мл и 175 мкг/мл достоверно уменьшал содержание CD197<sup>+</sup> ДК в культуре ( $p=0,016$  и  $p=0,009$  соответственно).

Результаты определения молекулы CD83 на поверхности ДК показали, что ЛС №№ 1–2 и ЛПС вызывали активацию клеток ( $p<0,05$ ) (табл. 4).

Табл. 4. Экспрессия молекул CD82, CD197, CD208, CD282 и CD284 дендритными клетками при сокультивировании с ЛС

Вещество	CD282 <sup>+</sup> , %		CD284 <sup>+</sup> , %		CD197, %	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	1,7(1,3–2,4)		56,3(54,1–61,4)		30,1(29,6–31,3)	
ПК	3,4(2,2–5,3)		79,2(65,1–82,1)		30,0(27,5–33,8)	
ЛС №1	3,6(2,6–4,0)	3,5(2,6–4,5)	69,2(59,3–72,5)	68,5(63,6–69,9)	29,6(22,9–30,0)	28,1(27,9–29,0)
ЛС №2	3,6(2,9–4,9)	3,3(2,5–3,6)	69,7(62,3–69,8)	70,1(66,4–75,6)	33,3(32,0–33,4)	32,0(31,3–35,0)
ЛС №3	2,0(1,6–2,0)	2,0(1,9–2,2)	58,4(55,9–58,9)	56,6(54,1–57,2)	28,8(26,9–32,5)	30,4(30,4–33,3)
ЛС №4	1,9(1,7–2,1)	2,0(1,7–2,1)	56,5(50,8–58,5)	60,4(52,7–61,3)	18,9(14,0–20,1)	12,3(10,6–18,4)
ЛС №5	2,5(1,5–2,6)	1,7(1,7–1,9)	57,8(55,6–60,2)	63,1(60,2–63,2)	32,0(31,2–32,7)	34,4(32,2–35,5)
ЛС №6	2,2(1,4–3,5)	2,3(1,8–3,5)	60,3(45,4–65,2)	53,5(45,2–60,1)	35,0(43,2–48,6)	30,2(25,0–40,4)
Вещество	CD83, %		CD208, %		CD208, % <sup>+</sup> ФНО-α	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	7,7(6,5–8,8)		5,6(2,2–6,8)		3,5(3,4–4,1)	
ПК	17,1(10,5–18,4)		74,6(72,1–82,6)		62,3(59,3–66,3)	
ЛС №1	18,0(13,0–22,0)	20,0(12,0–22,0)	42,6(35,6–45,6)	65,1(55,9–69,7)	70,2(65,5–72,2)	70,3(69,2–77,5)
ЛС №2	18,0(15,0–20,0)	15,0(15,0–22,0)	50,6(48,9–51,4)	65,7(63,6–68,8)	68,9(65,9–70,6)	75,8(69,3–76,3)
ЛС №3	11,5(10,2–13,0)	10,0(8,9–12,5)	4,8(4,2–7,0)	3,5(2,9–7,1)	65,9(65,0–69,2)	65,1(63,0–69,1)
ЛС №4	6,1(4,5–9,5)	3,1(3,1–8,0)	5,1(3,8–7,6)	6,3(5,1–7,3)	67,7(62,9–69,5)	66,6(65,0–71,4)
ЛС №5	7,3(7,0–9,3)	9,0(6,3–9,3)	5,4(4,1–7,7)	3,8(3,4–4,3)	71,7(66,5–72,1)	67,4(66,6–67,4)
ЛС №6	8,2(6,1–10,0)	7,5(6,0–9,0)	4,4(3,3–6,7)	3,6(2,2–7,8)	3,5(3,0–4,9)	2,8(1,3–5,2)

Также выявлена тенденция к усилению экспрессии данной молекулы в образцах ДК, инкубированных с инозин пранобексом ( $p=0,09$ ).

Молекула DC-LAMP – CD208 – один из маркеров активированных зрелых ДК слабо экспрессируется незрелыми ДК – как правило, не более 10% (табл. 4). Культивирование ДК с ЛПС и ЛС бактериального происхождения в 8 и более раз увеличило число CD208-позитивных ДК ( $p<0,01$ ). Отмечены статистически значимые различия между концентрациями ЛС №№ 1–2 ( $p<0,05$ ). Таким образом, определение данного маркера активации, несомненно, можно было бы рекомендовать к включению в протокол, но сложность пробоподготовки и большое количество ДК, необходимое для выполнения методики, вынуждает отказаться от определения данного маркера в рутинной практике.

Было предположено, что сами по себе вещества №№3–6 неспособны вызывать значимую активацию клеток, а их действие проявляется только вместе с другими более сильными активаторами, и усиливает их эффект. Для проверки этого предположения ДК культивировали с ФНО-α, одним из цитокинов, который вызывает умеренную активацию ДК и ЛС в тех же концентрациях, что и в других предыдущих экспериментах.

Для оценки эффекта был использован самый чувствительный маркер – CD208. Установлено, что как ДК, культивированные с ФНО-α, так и ДК, инкубированные с ФНО-α и ЛС экспрессировали молекулу CD208 в равной степени.

**Заключение.** Одно из важнейших направлений в области изучения ЛС подгруппы иммуномодуляторов – это разработка новых подходов к созданию усовершенствованных методов исследования (скрининга) иммуномодулирующей активности, сочетающие в себе такие характеристики, как точность, информативность, простота в выполнении, дешевизна.

Выбор моноцитарных ДК в качестве модели для тестирования веществ с потенциальным иммуномодулирующим действием был основан на экспрессии ДК огромного числа молекул, распознающих молекулярные паттерны различной природы и простотой получения клеток в лабораторных условиях.

В исследовании проведена оценка наличия на поверхности ДК молекул, интенсивность экспрессии которых возрастает в процессе активации, продукции важнейших про- и противовоспалительных цитокинов, жизнеспособности и апоптоза клеток после сокультивирования с исследуемыми веществами.

Подытожив результаты исследования ЛС, можно сделать заключение, что лишь ЛС на основе пробиотических штаммов бактерий обладают выраженными стимулирующими свойствами в отношении ДК. Инозин пранобекс вызывал слабую, но статистически достоверную активацию ДК, что проявилось в усилении экспрессии молекул CD205, CD83, HLA-DR и в усилении продукции ИЛ-12. В то же время, ЛС на основе умифеновира, азоксимера бромид и высокомолекулярного соединения на основе полифенола не оказали влияния на функциональную активность ДК.

Отобраны наиболее информативные показатели, пригодные для рутинного тестирования, а именно: содержание CD80<sup>+</sup>, CD32<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, ИЛ-12<sup>+</sup> ДК, интенсивность экспрессии молекул CD205 и HLA-DR. Исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее АПК при соблюдении нижеперечисленных условий:

- а) выявлено увеличение числа ДК, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD80 на 10% и больше в сравнении с отрицательным контролем;
- б) выявлено усиление интенсивности экспрессии молекулы гистосовместимости HLA-DR на 20% и больше в сравнении с отрицательным контролем;
- в) выявлено усиление интенсивности экспрессии рецептора CD205 на 10% и больше в сравнении с отрицательным контролем и/или выявлено увеличение числа ДК, экспрессирующих молекулы CD32 и/или CD80 на 10% и больше в сравнении с отрицательным контролем;
- г) число ДК в стадии апоптоза/некроза не отличается более, чем на 10% по сравнению с отрицательным контролем;
- д) число ДК, экспрессирующих молекулу CD197  $\geq$  таковому в отрицательном контроле;
- е) более 10% ДК продуцируют ИЛ-12.

На наш взгляд, предложенный метод отличается простотой, относительной дешевизной (для исследования необходимо 6 моноклональных антител и 2 зонда для определения жизнеспособности и апоптоза) и, одновременно, достаточной информативностью. Нельзя не отметить также легкую стандартизацию, высокую повторяемость и воспроизводимость тестов (чего сложно достичь при оценке экспрессии мРНК различных молекул, например, методом ДНК-биочипов). При этом, основное оборудование, необходимое для постановки тестов – проточный цитометр, широко распространено. Это обстоятельство позволяет внедрить предложенный метод практически в любой иммунологической лаборатории.

Результаты исследования убедительно доказывают возможность применения метода для тестирования (скрининга) иммуномодуляторов микробного и, в целом, биологического происхождения.

Тем не менее, ввиду того, что несколько широко применяемых лекарственных средств (умифеновир, азоксимера бромид, высокомолекулярное соединение на основе полифенола) не оказали в наших экспериментах никакого влияния на функциональные свойства ДК, остается открытым вопрос: имеет ли предложенный метод ограниченное применение в тестировании иммуностимулирующих веществ химического происхождения или протестированные ЛС не обладают ли иммуномодуляционным потенциалом, по крайней мере, в отношении АПК.

#### Литература:

- [1]. Миронов А. Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- [2]. Данченко Е. О. // Инфекция и иммунитет. 2011. № 2. С. 171-176.
- [3]. Гончаров А. Е. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 2. С. 4-12.
- [4]. Гончаров А. Е. и др. // Докл. НАН Беларусі. 2012. Т. 56, № 4. С. 94-102.
- [5]. Лусс Л. В. // Педиатрия, приложение consilium medicum. 2010. № 3. С. 72-76.
- [6]. Bang, C. et al. // PLoS One. 2014. Vol. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0099411.



- [7]. Gao D., Lawrence D. A. // *Meth. Mol Biol.* 2010. Vol. 598. P. 259–81.
- [8]. Huang X., Yang Y. // *Front. Microbiol.* 2011. Vol. 28. P. 202. doi: 10.3389/fmicb.2011.00202.
- [9]. Krishnaswamy J. K., Chu T., Eisenbarth S. C. // *Trends Immunol.* 2013. Vol. 34. P. 224–233.
- [10]. Milosevic E. et al. // *J. Neuroimmunol.* 2015. Vol. 15 – P. 64-70.
- [11]. Silin D. et al. // *Curr. Pharm. Des.* 2009. Vol. 15. P. 1238–1247.
- [12]. Stein M. F. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 459. P.42-48.
- [13]. Takechi H. et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013. Vol. 28. P. 3004-3013.
- [14]. Tsertsvadze T. et al. // *Georgian Med. News.* 2015. Vol. 240. P. 56-59.
- [15]. Vester H. et al. // *Eur. J. Med. Res.* 2015. Vol. 20. P. 84. doi: 10.1186/s40001-015-0180-y.
- [16]. Zhang X. et al. // *Thrombosis Res.* 2015. Vol. 135. – P. 352-361.
- [17]. Zhu X. M. et al. // *Pharmazie.* 2015. Vol. 70. P. 656-660.
- [18]. Carstens M. R. et al. // *Driving Biomaterial Innovation and the Race to Translation : 2015 Ann. Meet. Soc Biomater.* Charlotte, NC, Apr. 15-16, 2015. <http://2015.biomaterials.org/sites/default/files/abstracts/279.pdf>.
- [19]. Methods for testing an immune response using cultures of T cells, B cells, dendritic cells and follicular dendritic cells : pat. US8962319, USA : IPC C12N5/071; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0784; C12Q1/00;G01N33/50 (2013.01). Warren W.L. et al.; publ. date : 24.02.2015.

Поступила в редакцию: 03.03.2016 г.

*E. V. DUZH, A. Y. HANCHAROU*

## **MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELL AS AN IN VITRO MODEL FOR IMMUNOMODULATORY DRUGS TESTING**

*The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus*

### **Summary**

The aim of study was to estimate the feasibility of monocyte-derived dendritic cells usage in the testing of the substances with possible immunomodulatory effect. The method of routine testing of immunomodulation substances was developed. It includes the intensity of the expression of CD205, HLA-DR, CD80, CD32 and CD197 as well as the production of IL-12 by the DC. The advantages of proposed method are low cost, high reproducibility, easiness to standardize and fulfill, informative results.

The method was used in the current investigation for screening immunomodulators of different origin. It was established that only immunomodulators of bacterial origin exhibited stimulatory properties towards DC. Inosine pranobex caused a slight, but statistically significant activation of DC, the enhance of the expression of CD205, CD83, HLA-DR and IL-12 production. At the same time, umifenovir, azoximer bromide and a high polyphenol-based compound had no effect on the functional activity of DC.

*Key words:* dendritic cells, antigen presenting cell, immunomodulatory drugs, flow cytometry.